

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURA PARA A FORMULAÇÃO DE MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE FÚNGICA

RESUMO

A fermentação semissólida pode ser aplicada na produção de enzimas de origem microbiana utilizando fungos filamentosos. O objetivo deste estudo foi a produção de protease microbiana por fermentação em estado sólido utilizando planejamento de mistura. O agente de fermentação utilizado foi o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CCBP 001 e para avaliar a melhor formulação do meio de fermentação utilizou-se um planejamento experimental de mistura tipo Simplex-Centroid (adicionados de pontos inferiores) dos substratos mesocarpo de coco babaçu, fibra de coco babaçu e o farela de trigo. O tempo de fermentação foi de 96 h, com determinação da atividade proteolítica ao final do processo. Repetiu-se o melhor ensaio com o intuito de otimizar a produção de protease. A formulação de meio de fermentação que apresentou maior produção da enzima foi elaborada com 100% farelo de trigo. Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram o potencial de aplicação da enzima obtida e extraída nas condições otimizadas.

INTRODUÇÃO

A fermentação semissólida é definida e caracterizada pelo crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida e/ou no interior da mesma, estando essa matriz sólida com um valor de atividade de água que possibilite o crescimento e metabolismo do microrganismo, mas que, ao mesmo tempo, não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz sólida (PALMA, 2003).

Por apresentar menor custo na demanda de energia, equipamentos e tratamento de efluentes reduzido, a fermentação semi-sólida é tradicionalmente utilizada para a obtenção de enzimas de origem fúngica, à medida que é cada vez maior o interesse da indústria por microrganismos produtores de enzimas, visto que essas possuem uma ampla aplicabilidade (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997; PEREIRA, 2014).

Dentre as enzimas de origem microbiana de grande interesse por parte da indústria, tem-se a enzima protease, que possui aplicação em diversos setores industriais de detergentes; alimentícia; farmacêutica, produção de ração animal, dentre outras aplicações (LIMA, 2016). A aplicabilidade industrial viável, a produção enzimática deve ser eficiente e de baixo custo e os resíduos agroindustriais são excelentes alternativa por possuírem um baixo preço de mercado, sendo potenciais substratos para produção de enzimas comerciais de produzidas por microrganismos (MUKHTAR;HAQ, 2013; HARANGOZÓ; ZILAHY, 2015).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi a produção de protease microbiana por fermentação em estado sólido utilizando planejamento de mistura.

METODOLOGIA

Essa pesquisa foi desenvolvida no campus avançado da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de Imperatriz, Maranhão. Nos laboratórios de Microbiologia e Tecnologia de Cereais.

A linhagem do fungo filamentosos utilizados neste trabalho foi o *Aspergillus oryzae* CCBP 001 pertencente à coleção de trabalho da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará e cedida gentilmente à Universidade Federal do Maranhão.

Foi realizado um estudo de formulação do meio de fermentação e cinética de produção enzimática proteolítica, através de delineamento experimental de mistura tipo Simplex-Centroid com Pontos Interiores, visando a obtenção de maior atividade proteolítica.

Para avaliar a melhor formulação de meio de fermentação foi realizado um Delineamento experimental de misturas tipo *Simplex-Centroid* utilizados os substratos mesocarpo do coco babaçu (MB), farelo de trigo (FT) e fibra do coco babaçu (FCB) para compor as misturas contendo 10g em cada ensaio, no total de 10 ensaios experimentais. O tamanho do inóculo foi de 10^7 esporos de *A. oryzae* por gramas de meio, com o tempo de fermentação de 96 horas. Para todos os ensaios, as extrações dos extratos enzimáticos foram obtidas a partir da adição de água destilada e incubação de 1 hora a 30°C e filtração para a separação do sobrenadante. O sobrenadante foi armazenado em 18°C para a determinação enzimática proteolítica.

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Freitas (2013).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O ensaio que apresentou maior atividade de protease foi observado quando utilizou apenas o farelo de trigo apresentando 25,81 U/g, a segunda maior produção de 20,88 U/g foi quando misturou 50% de farelo de trigo e 50% de fibra do coco babaçu. A terceira melhor formulação para obtenção da atividade de protease foi com 66,7% de farelo de trigo, 16,65% de fibra de coco babaçu e 16,65% mesocarpo do babaçu onde obteve-se 19,63 U/g.

Fermentação em meio semi-sólido, apresenta características vantajosas utilizando substratos com fontes altas de energias, carboidratos e baixa atividade de água. Na composição de trigo contém cerca de 70% de carboidratos e os outros 30% são proteínas, vitaminas e minerais. Já o farelo de trigo tem em média 31% de celulose, 26% de hemicelulose, 24% de lignina e 7% cinzas, sendo um substrato considerado como fonte de nutrientes para produção de enzimas (BAKKER, 2017; SANTOS et al., 2008). Dessa forma, o presente estudo, utilizando apenas farelo de trigo, apresentou maior quantidade de atividade proteolítica.

Além de ser rico em proteínas, ácidos graxos e carboidratos, o farelo de trigo tem também características físicas como textura e porosidade que podem facilitar a dispersão dos

fungos, contribuindo para a maior produção enzimática quando comparado aos demais meios fermentativos em questão (PANDEY, 2013).

Fibra do coco babaçu possui propriedades de absorção de água, fibroso, arenoso e lignocelulósico (SILVA et. al. 2018), em conjunto com as composições de mistura binária de farelo de trigo com a fibra do coco babaçu, esse substrato desempenha um papel importante na produção de enzimas.

O mesocarpo do babaçu é uma fonte rica em amido (68,30%), contendo vitaminas e sais minerais (FRANÇA et. al. 2014). A formulação ternária, do mesocarpo do babaçu, farelo de trigo e fibra do coco babaçu apresenta um substrato biodegradável como um grande potencial para a produção de enzimas proteolíticas, onde, a composição de amido, celulose e fibras são fatores decisivos no processo fermentativo semi-sólido.

Na Figura 1 apresenta a superfície de resposta para Atividade de protease no planejamento experimental de mistura.

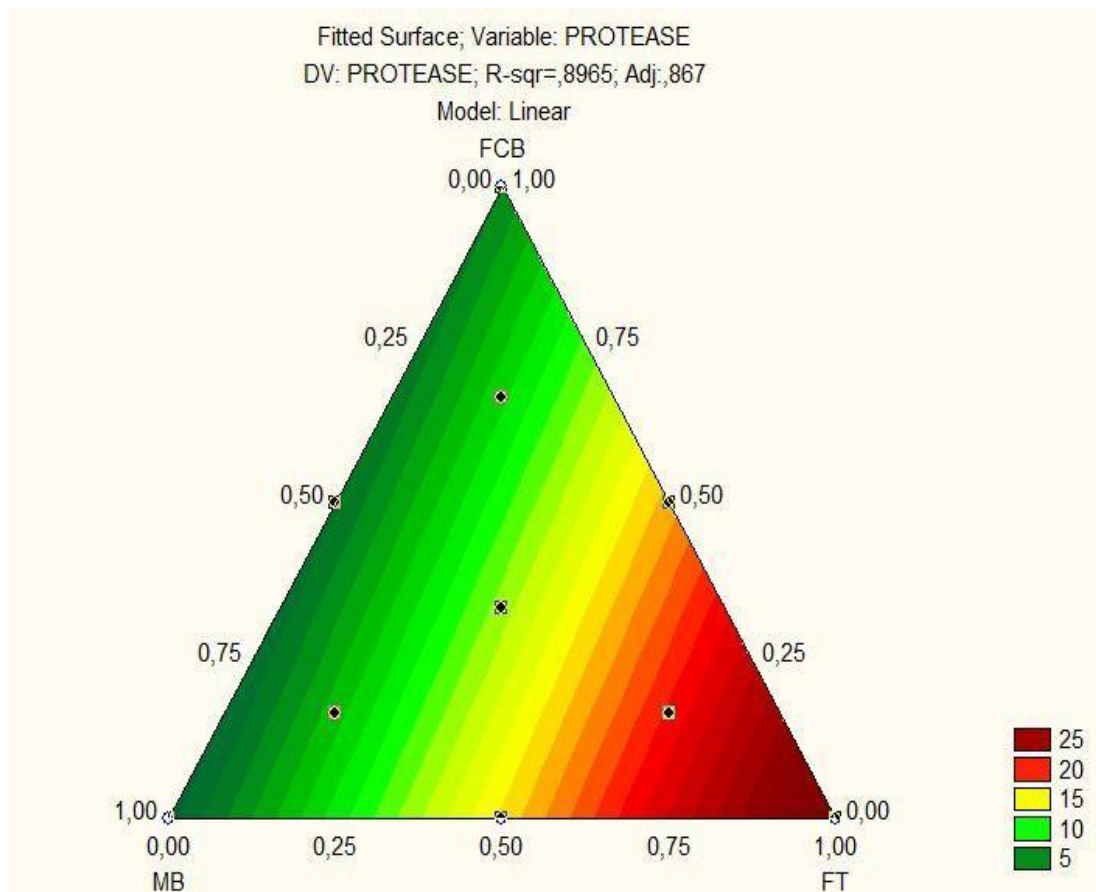


Figura 1: Superfície de resposta ternária de mistura sendo Mesocarpo do babaçu (MB), Farelo de trigo (FT) e Fibra do coco babaçu (FCB).

Segundo o estudo de Silva (2017), a produção da enzima microbiana em estado semi-sólido, no tempo de 96 h utilizando torta do babaçu como substrato, obtém-se uma atividade proteolítica de 109,5 U/g.

De acordo com Santos et. al. (2020), a obtenção da enzima microbiana *Aspergillus tamarii* URM 4634 em estado de fermentação sólido, no tempo de 72 h utilizando 5 g de farelo de trigo, obteve atividade de protease de 116,6 U/mL.

Nas análises de Castro, Freitas, Pinto (2009), com a fermentação em estado semi-sólido nos tempos de 24 h e 48 h utilizou-se película da casca da castanha de caju como substrato e teve uma produção de 15,16 U/g de protease microbiana *A. oryzae* IV.

CONCLUSÃO

Foi possível a obtenção de protease do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* CCBP 001, utilizando substratos mesocarpo do babaçu, farelo de trigo e fibra do coco babaçu. E verificou-se que por meio do planejamento de mistura que o substrato farelo de trigo foi o melhor substrato para produção da enzima. Formulações contendo farelo de trigo em maior proporção também obtiveram resultados expressivos quanto à atividade de protease, sendo elas: farelo de trigo combinado com fibra de coco babaçu e farelo de trigo combinado com fibra do coco babaçu e mesocarpo do coco babaçu.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus Aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
2. VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. **Dordrecht**: Kluwer Academic Publishers, p. 5-22, 1997.
3. PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. TCC (Graduação) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
4. LIMA, E. N. **Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato-Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.
5. MUKHTAR, H.; HAQ, I. Comparative Evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *Bacillus subtilis* in submerged and solid state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2013,p. 1-7, 2013.
6. HARANGOZÓ, G.; ZILAHY, G. Cooperation between business and non-governmental organizations to promote sustainable development. **Journal of Cleaner Production**, v. 89, p. 18-31, 2015.
7. FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* ccbp 001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
8. BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduos farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. 144 f. Tese (Doutorado em engenharia química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2017.
9. SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1-2, 2008.
10. PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.
11. SILVA, C. B. S.; RIBEIRO, F. T. R.; MALVEIRA, J. Q.; RIOS, M. A. S. Caracterização energética da casca do coco babaçu. In: **XXXVI Encontro de Iniciação Científica**, 2018, Encontros Universitários da UFC, 2018.
12. FRANÇA, R. C. CHAGAS-JUNIOR, A. F.; CARVALHO, E. E. N.; GUIMARÃES, L. G. L.; ERASMO, E. A. L.; OLIVEIRA, L. A. Mesocarpo de coco babaçu (*Orbignya sp.*) como fonte de carbono para produção de meios de cultura para *Trichoderma*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 88-94, 2014.
13. SILVA, L. A. **Produção e caracterização de protease alcalina a partir de substrato do coco babaçu (*Orbignya Speciosa*)**. 2017. Dissertação (graduação) – Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2017.
14. SANTOS, A. F. A *et al.* Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 25663-25676, 2020.
15. CASTRO, R. J. S.; FREITAS, A. C.; PINTO, G. A. S. Efeito da quantidade inicial de água na síntese de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, nº 17, 2009, Natal. Anais. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.